国家项目点击

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.005

甘露消毒丹对流感病毒感染“升清降浊”的机制研究

刘光华[1],张文涵[1],吴振起[2],刘玉婷[1],曲根生[1],赵健翔[1],赵炟[1]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034)

摘要:目的 通过甘露消毒丹(Ganlu Xiaodu Micropill,GXM)对流感病毒(Influenza virus,IV)感染小鼠能量代谢及视黄酸诱导基因Ⅰ(Retinoicacid-inducible gene I,RIG-I)/线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondrial antiviral signaling protein,MAVS)/核因子κB(Nuclear factor-κB,NF-κB)通路的调节机制,探究其“升清降浊”作用的分子机制。方法 将96只BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、GXM组、磷酸奥司他韦(Oseltamivir)组。除正常组小鼠外,其余各组小鼠进行IV感染模型处理,于造模第7天进行小鼠旷场实验后取材。苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining,HE)观察肺组织病理变化;电镜下观察小鼠肺组织细胞细胞器病理改变;qPCR法检测小鼠肺组织中核因子κB p65(Nuclear factor kappa-B p65,NF-κB p65)、MAVS、RIG-1、乳酸脱氢酶A(Lactate dehydrogenase A,LDHA)mRNA表达情况;Western blot法测定小鼠肺组织中MAVS、NF-κB、RIG-1蛋白含量;酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测小鼠血清中白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)、LDH、干扰素β(Interferon-β,IFN-β)、白细胞介素-10(Interleukin-10,IL-10)含量。结果 与正常组相比,IV感染后,小鼠肺泡结构破坏严重,存在大量炎症细胞浸润及毛细血管扩张;肺组织超微结构破坏,肺泡结构断裂,细胞器数目减少,部分线粒体外膜及嵴减少或消失模糊;各组小鼠的行走总路程和行走平均速度显著减少($P<0.05$);小鼠肺组织中RIG-1、NF-κB p65、MAVS、LDHA mRNA和蛋白的表达明显升高,小鼠血清中IL-6、IFN-β、LDH含量升高,血清IL-10含量下降($P<0.05$)。与模型组相比,GXM组小鼠的行走总路程和行走平均速度均呈显著性增加,Oseltamivir组行走平均速度显著升高,Oseltamivir组小鼠的平均速度明显低于GXM组($P<0.05$);RIG-1、NF-κB p65、MAVS、LDHA mRNA和蛋白的表达降低,血清中IL-6、IFN-β、LDH含量降低,血清中IL-10水平升高($P<0.05$),两治疗组给药后变化趋势一致,其中GXM组肺组织RIG-I mRNA表达下降明显,Oseltamivir组小鼠血清中IL-6、IFN-β改善明显($P<0.05$)。结论 GXM具有调节IV感染后小鼠炎症因子表达和能量代谢的作用,可能通过RIG-I/MAVS/NF-κB信号通路实现调控IV感染的“升清降浊”作用。

关键词:流感病毒;甘露消毒丹;升清降浊;能量代谢;RIG-1/MAVS/NF-κB
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0021-07

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81403293);国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才项目(国中医药人教函〔2022〕239号);辽宁省教育厅重点攻关项目(LJKZZ20220104);辽宁中医药大学自然科学类重点项目(2021LZY039)
作者简介:刘光华(1974-),女,辽宁阜新人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治感染性疾病。

[39] 牛玉硕,冉霓,胡晓雯,等.学龄前儿童功能性便秘风险预测模型的构建[J].中国儿童保健杂志,2023,30(6):612-616.
[40] 陈洁,陈镜如,周兆馨,等.基于中医体质及危险因素的儿童功能性便秘风险预测模型构建[J].北京中医药,2024,43(2):204-207.
[41] 代志鹏,郑稼,高延征,等.谷胱甘肽在激素诱导的BMSCs功能失调中的作用[J].中国修复重建外科杂志,2018,32(1):91-98.
[42] 朱丹.名老中医治疗脂肪性肝病的证治规律研究及知识图谱构建探索[D].北京:中国中医科学院,2019.
[43] 贺煜竣,何就杰,范郁山,等.基于数据挖掘技术分析针灸治疗代谢相关脂肪性肝病的选穴规律[J].针刺研究,2024,49(4):424-433.
[44] 贾睿,禄保平.药物性肝损伤病因病机探析[J].中医研究,2011,24(1):32-33.
[45] 陈昭,郑蕊,邱瑞瑾,等.基于数智融合的中西药并用代谢性药物肝损伤预警方法的构建[J].中华中医药杂志,2023,38(4):1413-1417.
[46] 焦云涛.中药联合恩替卡韦治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎疗效评价及预测模型研究[D].北京:北京中医药大学,2017.
[47] 李梢,张宁波,李志红,等.慢性乙型肝炎患者肝胆湿热证和肝郁脾虚证的决策树诊断模型初探[J].中国中西医结合杂志,2009,29(11):993-996.
[48] GAN P L, HUANG S, PAN X, et al. Global research trends in the field of liver cirrhosis from 2011 to 2020: a visualised and bibliometric study [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(33): 4909-4919.
[49] 裴卫,吴辉坤,李晓东,等.基于机器学习的中医治疗肝硬化组方规律研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(6):950-956.
[50] 张明琪,邓鑫.基于集成学习后融合神经网络算法构建肝硬化代偿期中医智能辨证模型的探讨[J].广州中医药大学学报,2023,40(10):2650-2660.
[51] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
[52] 刘鹏,陈青山,杨建波.柴胡疏肝散加减联合射频消融治疗肝癌疗效研究[J].陕西中医,2022,44(7):892-896.
[53] 王和沪,王云启.近10年中医药治疗肝癌的CiteSpace知识图谱分析[J].中西医结合肝病杂志,2023,33(4):343-347.
[54] 曹鹏.基于机器学习构建原发性肝癌中西医预后模型研究[D].上海:上海中医药大学,2019.

"Ascending The Clear and Descending The Turbid" Mechanism of Ganlu Xiaodu Micropill (甘露消毒丹) on IV Infection

LIU Guanghua[1], ZHANG Wenhan[1], WU Zhenqi[2], LIU Yuting[1], QU Gensheng[1], ZHAO Jianxiang[1], ZHAO Da[1]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;
2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medicine University, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* The study investigated the molecular mechanism of "ascending the clear and descending the turbid" effect of Ganlu Xiaodu Micropill (甘露消毒丹, GXM) on retinoicacid-inducible gene 1 (RIG-1)/mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)/nuclear factor-κB (NF-κB) pathway in influenza virus (IV)-infected mice. *Methods* Ninety-six SPF-grade BALB/c mice were randomly divided into normal, model, GXM and Oseltamivir groups. Except for the mice in the normal group, the IV infection mode in the other groups was set up and sampled on day 7 of modelling after the mouse abscission experiment. HE staining was used to observe pathological changes in lung tissues. The pathological changes in organelles of mouse lung tissue cells were observed under electron microscope. The mRNA expressions of nuclear factor kappa-B p65 (NF-κB p65), MAVS, RIG-1 and lactate dehydrogenase A (LDHA) were detected in mouse lung tissues by qPCR method. Western blot method was used to determine the protein contents of MAVS, NF-κB and RIG-1 in mouse lung tissues and serum levels of interleukin 6 (IL-6), LDH, Interferon-β (IFN-β) and interleukin-10 (IL-10) were detected in mouse serum by ELISA method. *Results* Compared with those in the normal group, after IV infection, the alveolar structure of mice was severely damaged, with the presence of a large number of inflammatory cell infiltration and capillary dilatation; the ultrastructure of lung tissue was damaged, the alveolar structure was broken, the number of organelles was reduced, and part of the outer membrane and cristae of mitochondria were reduced or disappeared; the total distance and the average speed of walking of mice in all the other groups were significantly reduced ($P<0.05$). The pulmonary tissue of mice had a significant decrease in the expressions of RIG-1, NF-κB p65, MAVS, LDHA mRNA and protein in the lung tissues of mice were significantly elevated; the serum levels of IL-6, IFN-β and LDH in mice were elevated, and the serum IL-10 level was decreased ($P<0.05$). Compared with those in the model group, the total distance and the average speed of walking were significantly increased in the GXM group, the average speed of walking was significantly higher in the Oseltamivir group, and the average speed of mice in the Oseltamivir group was significantly lower than that in the GXM group ($P<0.05$). The expressions of RIG-1, NF-κB p65, MAVS, LDHA mRNA and protein were reduced, the serum levels of IL-6, IFN-β and LDH were reduced, and the serum levels of IL-10 were increased ($P<0.05$), and the trends of changes were consistent between the two treatment groups after administration of the drug, in which the expression of RIG-I mRNA in lung tissues of the GXM group was decreased significantly, and the improvement of serum levels of IL-6 and IFN-β in mice of the Oseltamivir group was obvious ($P<0.05$). *Conclusion* GXM regulates the expressions of inflammatory factors and regulates energy metabolism in IV infection, possibly through the RIG-I/MAVS/NF-κB pathway, which regulates the "ascending the clear and descending the turbid" effects of IV infection.

Keywords: influenza virus; Ganlu Xiaodu Micropill (甘露消毒丹); ascending the clear and descending the turbid; energy metabolism; RIG-1/MAVS/NF-κB

流感病毒(Influenza virus, IV)是引起呼吸道疾病的主要病原体之一,具有潜伏期短、传染性强、传播速度快等特点,对公共健康构成严重威胁[1]。IV感染后,挟持宿主细胞代谢以满足大量中间代谢产物和能量的需求,导致机体内线粒体异常代谢,同时可诱发炎症因子的大量释放[2-3]。甘露消毒丹(Ganlu Xiaodu Micropill, GXM)广泛应用于抗IV的临床治疗中[4],为"治湿温时疫之主方",具有利湿化浊、清热解毒的功效[5],能够促进清阳上归于肺输布周身,加速湿热浊毒排出体外,蕴含"升清降浊"之意。因此,本研究从视黄酸诱导基因I(Retinoicacid-inducible gene I, RIG-I)/线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)/核因子κB(Nuclear factor-κB, NF-κB)信号通路及能量代谢角度,探讨GXM对IV感染"升清降浊"作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与菌株 选取96只SPF级BALB/c小鼠,4~6周龄,雌雄各半,体质量(19±1)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。甲型IV鼠肺适应株A/FM1/47(H1N1)进行试验,由辽宁中医药大学附属医院病毒室提供。

1.2 实验药品 GXM药物组成如下:滑石、茵陈蒿、黄芩、连翘、木通、射干、薄荷、川贝、藿香、石菖蒲、白豆蔻,均购于辽宁中医药大学附属医院门诊药局,经辽宁中医药大学中药分析教研室鉴定为正品。上述药材根据前期研究的最佳提取工艺,采用饮片8倍量的70%乙醇对药物进行加热回流提取1 h×3次,收集3次提取的药液混匀,进一步浓缩烘干药液至粉末状,计算出膏率为12.5%,将中药及西药依据人和动物表面积折算的等效剂量比率表进行换算,制成含生药0.334 g/mL混悬

液。阳性对照药物:磷酸奥司他韦(Oseltamivir)颗粒(宜昌东阳光长江药业股份有限公司,国药准字 H20065415)75 mg,以去离子水配制成有效浓度为 2.4 mg/mL 的溶液,置于 4 ℃冰箱保存备用。

1.3 试剂 动物用异氟烷(瑞沃德公司,R510 - 22 - 10);4%多聚甲醛(广州赛国生物,BL539A);苏木精 - 伊红(Hematoxylin - eosin,HE)染色试剂盒(北京索莱宝,G1121 - 4);Enhanced BCA Protein Assay κ it、Western Rapid Transfer Buffer(Powder)(上海碧云天,P0010s、p0575 - 101);小鼠乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒(南京建成,A020 - 2 - 2);小鼠白细胞介素 - 6(Interleukin 6,IL - 6)、白细胞介素 - 10(Interleukin - 10,IL - 10)、干扰素 - β(Interferon - β,IFN - β)酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(上海江莱,JL20268、JL20242、JL20219);重组 Anti - RIG/DDX58 抗体、重组 Anti - NF - κB p65 抗体(Abcam 公司,ab302778、ab32536 - 10);Anti - MAVS(武汉博士德,A00169 - 4)。

1.4 仪器 自动组织脱水处理机(LEICA,TP1020);双人超净工作台(沈阳环中,LJH - 4);低温高速离心机(Heraeus,Biofuge 28RS);石蜡包埋机(LEICA,EG1150);手动石蜡切片机(LEICA,RM2235);电子显微镜(HITACHIH 公司,HITACHIH - 600);实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,7500);超纯水系统(Heal Force,NW10LVF);高压电泳仪电源(Bio - rad,1645052);PowerPac™ Universal Power Supply 电泳通用型电源(Bio - Rad);Trans - Blot SD 半干转印系统(Bio - Rad);Tanon 化学发光成像系统(天能科技,5200)。

2 方法

2.1 动物分组 常规适应性喂养 3 d 后,将 96 只小鼠采用随机数字表法随机分为空白组、模型组、GXM 组、Oseltamivir 组,每组 24 只。

2.2 造模方法 适应性喂养后,除正常组外均建立 IV 感染模型。模型建立方法:先用乙醚进行轻度麻醉,后分别用移液枪抽取甲型 IV FM1 株对小鼠进行鼻腔滴注(其中正常组以 0.9%氯化钠无菌溶液代替),0.1 mL/只。

2.3 给药方法 在造模成功后对小鼠进行药物干预,每只小鼠 0.3 mL·次$^{-1}$·d^{-1},灌胃给药。正常组和模型组同时灌胃等量生理盐水,GXM 组与 Oseltamivir 组分别给予相应剂量的药物,连续 7 d。于第 7 天给药后,每组随机取 6 只小鼠禁食、禁水,4 h 后取材。

2.4 旷场实验 给药后第 7 天取材前进行小鼠旷场实验,记录分析其运动总路程和平均速度。

2.5 肺组织病理学检测 取小鼠肺组织,经脱水、透明、包埋、切片等处理后进行 HE 染色及读片。

2.6 qPCR 法检测肺组织中 NF - κB p65、MAVS、RIG - 1、LDHA 的 mRNA 表达 取小鼠肺组织充分研磨,应用 Trizol 提取液提取细胞总 RNA,分析 RNA 的纯度及完整性。RNA 质量合格后进行 cDNA 反转录,并以反转录产物为模板,加入 NF - κB p65、MAVS、RIG - 1、LDHA 的引物,进行 qPCR 检测。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5′-3′)	片段长度/(bp)
GAPDH	上游:CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游:TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
RIG - 1	上游:TGTGTGGCTCGCAACTACCTG	224
	下游:CGTATGGTGATCCTTCCCTCCT	
NF - κB p65	上游:CGAGTCTCCATGCAGCTACG	212
	下游:TTTCGGGTAGGCACAGCAATA	
MAVS	上游:TCTCCTAACCAGCAGGCTCTCA	143
	下游:TGGAAGGAAACGGTTGGAGAC	
LDHA	上游:TAATGAAGGACTTGGCGGATGA	157
	下游:ACCAGCTTGGAGTTCGCAGTTA	

2.7 Western blot 测定肺组织中 MAVS、NF - κB、RIG - 1 蛋白表达 提取小鼠肺组织总蛋白,BAC 试剂盒进行蛋白定量。每孔加 10 μL 的蛋白上样,电泳分离、转膜后加入奶粉进行封闭。MAVS、NF - κB、RIG - 1 一抗均按照 1∶2000 稀释后在室温中进行孵育。T - BST 洗膜后,加入二抗室温摇床孵育,T - BST 洗膜。加入适量 ECL 发光液,进行曝光、拍摄图片。

2.8 ELISA 法检测血清 IL - 6、IL - 10、IFN - β、LDH 含量 取小鼠眼眶血,静置、离心后收集血清,并对血清中 IL - 6、IL - 10、IFN - β、LDH 的含量进行检测。

2.9 统计学方法 使用 SPSS 27.0 软件进行分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式进行组间比较,使用单因素方差分析法,组间对比用 LSD(Least Significant Difference)检验,当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 旷场实验结果分析 IV 感染后,各组小鼠的行走总路程和行走平均速度显著减少($P < 0.05$);治疗后,GXM 组小鼠的行走总路程和行走平均速度均呈显著性增加 ,Oseltamivir 组行走平均速度显著升高($P < 0.05$),Oseltamivir 组小鼠的平均速度明显低于 GXM 组($P < 0.05$)。见表 2、插页Ⅵ图 1。

表 2 各组小鼠在旷场实验中平均运动总路程、平均运动速度变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均运动总路程/(cm)	平均运动速度/(cm/s)
正常组	6	808.33 ± 39.76	7.01 ± 0.43
模型组	6	496.07 ± 59.27 *	0.03 ± 0.59 *
GXM 组	6	584.76 ± 37.66 *#	4.07 ± 0.92 *#
Oseltamivir 组	6	540.30 ± 5.33 *	0.09 ± 0.86 *#△

注:* 与正常组比较,$P < 0.05$;# 与模型组比较,$P < 0.05$;△ 与 GXM 组比较,$P < 0.05$。

3.2 肺组织病理学结果分析 正常组小鼠肺泡形态清晰完整,肺泡间隔无增厚,未见炎性细胞浸润;模型组小鼠肺泡结构破坏严重,且存在大量炎症细胞浸润及毛细血管扩张;GXM 组小鼠肺泡间隔增宽,镜下完整者较多,细支气管和血管处可见炎症细胞浸润;Oseltamivir 组小鼠肺泡间隔增厚,炎细胞浸润较少,肺内水肿充血情况较轻。见插页Ⅵ图 2。

3.3 肺组织电子显微镜下结果分析 正常组小鼠的Ⅱ型肺泡结构完整,核膜清晰,细胞间连接紧密,细胞器结构清晰。模型组小鼠肺组织超微结构破坏,肺泡结构断裂,细胞器数目减少,部分线粒体外膜及嵴减少或消失模糊。GXM 组小鼠Ⅱ型肺泡细胞表面微绒毛较多,细胞核膜清楚,胞质内有外膜及嵴较清楚。Oseltamivir 组小鼠Ⅱ型肺泡细胞胞质内线粒体外膜及嵴

不清楚数量相对正常组有所减少，肺泡结构及间质内胶原纤维排列较紊乱。见插页Ⅶ图 3。

3.4 qPCR 检测 RIG－1、NF－κB p65、MAVS、LDHA mRNA 变化 与正常组相比，模型组小鼠 RIG－1、NF－κB p65、MAVS、LDHA mRNA 表达均上升（$P<0.05$）；与模型组相比，GXM 组和 Oseltamivir 组小鼠 RIG－1、NF－κB p65、MAVS、LDHA mRNA 表达均下降（$P<0.05$）。其中，两治疗组给药后各指标变化趋势一致，两治疗组间 RIG－I mRNA 比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表 3。

表 3 各组小鼠肺组织中 RIG－1、NF－κB p65、MAVS、LDHA mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	RIG－1	NF－κB p65	MAVS	LDHA
正常组	3	1.00±0.15	1.00±0.05	1.00±0.15	1.00±0.15
模型组	3	4.83±0.60*	13.14±.05*	11.50±1.98*	4.75±0.34*
GXM 组	3	3.54±0.97*#	8.66±0.24*#	6.94±1.85*#	2.83±0.35*#
Oseltamivir 组	3	3.71±0.31*#△	9.78±0.74*#	8.28±1.10*#	3.32±0.55*#

注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$；△与 GXM 组比较，$P<0.05$。

3.5 Western blot 检测 RIG－1、NF－κB p65、MAVS 蛋白变化 与正常组相比，其余 3 组小鼠的 RIG－1、NF－κB p65、MAVS 蛋白表达均上升（$P<0.05$）；与模型组相比较，GXM 组和 Oseltamivir 组小鼠的 RIG－1、NF－κB p65、MAVS 蛋白表达均有不同程度下降（$P<0.05$），但两给药组之间差异不明显（$P>0.05$）。见图 4。

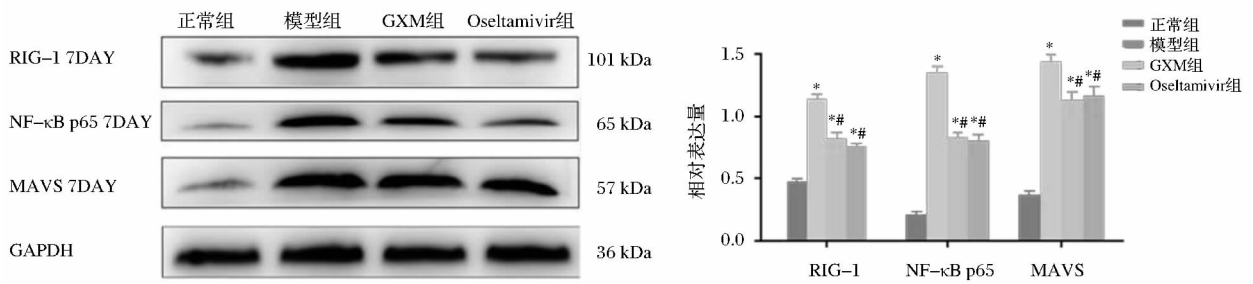
3.6 ELISA 结果分析 IV 感染后，模型组与两治疗组小鼠血清中 IL－6、IFN－β、LDH 含量均呈上升趋势，血清 IL－10 含量下降（$P<0.05$）。药物治疗后，各治疗组 IL－6、IFN－β、LDH 含量有所降低，血清中 IL－10 水平升高（$P<0.05$）。两治疗组小鼠血清中各指标效应趋势一致，其中 GXM 组 IL－6、IFN－β 的含量略高于 Oseltamivir 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 4。

4 讨论

IV 是一种常见的 RNA 囊膜病毒，其中甲型 IV 极易发生免疫逃逸且宿主范围最广，是人类感染率最高的类型[6]。IV 所造成的急性呼吸道感染，每年发病率为 5%～15%，其中病死者可达 30 万～65 万人[7]。目前，针对 IV 感染除接种疫苗预防外，多以抗病毒治疗为主[8]，但抗病毒药物的不良反应及 IV 的耐药性问题逐渐引起重视。

流感，古称“时行感冒”，属“疫病”“时行病”“温病”范畴。IV 感染主要临床特点是突然发病，伴高热、头痛、全身肌肉酸痛、乏力等，具有“湿毒”的致病特点。流感多由口鼻而入侵袭于肺，肺主气司呼吸，正邪交争，肺宣发肃降失畅，进而影响周身气机之转输，清浊不分，逆转失司。然“清阳实四肢，浊阴走五脏”；肺为气之主，脾胃为气血生化之源，“脾气散精，上归于肺，通调水道，下输膀胱，水精四布，五经并行”，二者相因输布精微物质于周身，清升浊降，气自顺宜，内养五脏六腑，外养四肢百骸、皮毛诸窍。气是人体清浊的生成与输布的动力维续，清升浊降亦是人体正常生理功能维持稳态的基础。现代医学证实，人体各项机能的能量运转因线粒体的作用得以供续，线粒体遍布于胞内，通过三羧酸循环产生机体活动所需三磷酸腺苷[9]，这与中医清阳之气的功能相类似，故病本于气，亦是病本于能量。线粒体与 RIG－I/MAVS/NF－κB 通路密切相关，可直接参与到免疫反应中，IV 感染机体后固有免疫三大通路之一 RIG－I/MAVS/NF－κB 通路最先被激活[10]。MAVS 是参与线粒体、过氧化物酶体和线粒体相关内质网膜中的 RIG－I 样受体信号转导的接头蛋白[11－12]。IV 感染后，首先被位于细胞膜上的 RIG－I 蛋白识别，经 MAVS 介导下游 NF－κB 信号，加剧了炎症因子的释放[13－14]。有研究发现，敲除小鼠 MAVS 基因后，小鼠血清中 I 型干扰素、炎性因子等含量减少[15]。此外，IV 进入人体后会破坏宿主细胞，直接释放线粒体 DNA 入血，激活 NF－κB 信号通路[16]。肌肉酸痛、浑身乏力症状为 IV 感染的特征性症状，与湿毒邪气侵袭，人体清正被邪浊之气所困密切相关，与“升清降浊”失司的特点相似。而现代研究认为，此症状多与体内糖酵解导致的 LDH 改变、线粒体结构功能异常有关[17]。线粒体异常除可引发体内 LDH 活跃性改变外，胞内 LDH 亦可透过被损伤的细胞膜释放入血，可见血清内 LDH 的释放率侧面反映了 IV 对细胞的杀伤力[18]。IV 感染除引发呼吸道症状外，也会产生脑部症状，如自发行为改变，并伴有不同程度的情绪改变[19－20]，IV 诱发的“细胞因子风暴”亦可对中枢神经系统紊乱产生影响，而炎症因子又可及时反映 IV 感染后体内能量代谢异常所致的免疫细胞紊乱状态[21－22]。

GXM 记载于王孟英的《温热经纬》，体现开上、畅中、渗下的配伍理念。其中黄芩、滑石和茵陈清热利湿，相伍为君以利浊下渗；臣以藿香、石菖蒲芳香化湿，通窍辟秽，散邪解毒，助清阳以宣达；白蔻仁燥湿行气，悦脾和中，以绝化痰生浊之源；木通清心利下，泻火护土以助金，使中焦气机振奋畅达；连翘、薄荷辛凉宣散解毒，祛三焦湿热；川贝母配射干，清热解毒、散结消肿，清贮痰之器，四药相佐宣上焦郁热。全方用药浮沉相宜，芳香宣化以升清，祛湿通利以降浊，使存于三焦之湿热毒邪不攻自破，气机畅利，流通自如，诸证得消[23]。因势利导，多渠道祛除感受之邪气，以恢复机体清明状态，实现机体与环境的清浊稳态平衡，体现“升清降浊”之意。本课题组前期研究证实，GXM 挥发油可能通过黏膜免疫对雾霾环境下 IV 所致的湿毒模型小鼠发挥抑制 IV 感染和复制作用[24]，并且 GXM 精简方可以通过NF－κB信号通路抑制NLRP3炎性小体通路激活，



注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图 4 各组小鼠肺组织 RIG－1、NF－κB p65、MAVS 蛋白的表达

表 4 各组小鼠 IL－6、IFN－β、IL－10、LDH 含量检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

单位:pg/mL

组别	n	IL－6	IFN－β	IL－10	LDH
正常组	6	45.51 ± 0.98	19.25 ± 0.21	41.78 ± 1.54	201.51 ± 21.41
模型组	6	140.94 ± 1.67 *	57.44 ± 0.35 *	14.33 ± 0.73 *	844.28 ± 6.88 *
GXM 组	6	133.39 ± 0.69 *#	53.81 ± 0.38 *#	17.32 ± 1.06 *#	660.05 ± 64.08 *#
Oseltamivir 组	6	125.32 ± 1.33 *#△	52.25 ± 0.48 *#△	16.68 ± 0.92 *#	675.32 ± 25.33 *#

注:* 与正常组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与 GXM 组比较,$P<0.05$。

减少 IL－1β 等炎症因子释放[25]。

综合比较各项实验结果发现,IV 感染后,小鼠肺组织超微结构破坏,肺泡结构断裂,细胞器数目减少,部分线粒体外膜及嵴减少或消失模糊;小鼠肺组织中 RIG－1、MAVS、LDHA mRNA 和蛋白的表达升高,血清中 LDH 含量增加。药物治疗后,小鼠Ⅱ型肺泡细胞表面微绒毛增多,细胞核膜清楚,胞质内有外膜及嵴、肺泡结构及间质内胶原纤维排列逐渐清楚;小鼠 RIG－1、MAVS、LDHA mRNA 和蛋白的表达降低,血清中 LDH 含量亦呈下降趋势,两治疗组给药后变化趋势一致,但 GXM 组 RIG－I mRNA 表达下降更加明显。提示 GXM 会对 IV 感染引起的线粒体形态结构损伤及能量代谢功能改变发挥调控作用,体现其“升清”之意。进一步观察实验炎症因子指标的改变发现,IV 感染后,小鼠肺组织中 NF－κB p65 mRNA 及蛋白、血清中 IL－6、IFN－β 含量升高,血清中 IL－10 含量下降。药物治疗后,小鼠肺组织中 NF－κB p65 mRNA 和蛋白的表达降低,血清中 IL－6、IFN－β 含量降低,血清中 IL－10 水平升高,其中 Oseltamivir 组小鼠血清中 IL－6、IFN－β 含量的回调更加显著。提示 GXM 可能控制 IV 感染引起肺部炎症损伤,通过缓解炎症反应,发挥其“降浊”之功。IV 感染后,各组小鼠的行走总路程和行走平均速度显著减少;用药干预后,GXM 组小鼠的行走总路程和行走平均速度均呈显著性增加,Oseltamivir 组行走平均速度显著升高,Oseltamivir 组小鼠的平均速度明显低于 GXM 组。提示 IV 感染亦能对中枢神经系统产生一定的影响,而 GXM 可能在一定程度上缓解脑部症状。

综上所述,GXM 具有调节 IV 感染后小鼠炎症因子表达和能量代谢的作用,可能通过 RIG－I/MAVS/NF－κB 信号通路实现调控 IV 感染的“升清降浊”作用。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心. 中国流感疫苗预防接种技术指南(2022—2023)[J]. 中国病毒病杂志, 2023, 13(1): 1－19.
[2] 彭琦, 江瑾玥, 潘建鑫. 重症甲型 H1N1 流感病毒性肺炎 20 例临床特点分析[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(11): 1645－1649.
[3] KUMARI R, SHARMA S D, KUMAR A, et al. Antiviral approaches against influenza virus [J]. Clin Microbiol Rev, 2023, 36(1): e0004022.
[4] 刘光华, 王贵帮, 杨慧, 等. 甘露消毒丹制方特点探微[J]. 四川中医, 2017, 35(11): 32－35.
[5] 刘光华, 贾晓儒, 敏娜, 等. 甘露消毒丹及其挥发油对流感病毒感染小鼠肺部炎症相关因子的影响[J]. 中国医学创新, 2018, 15(3): 1－6.
[6] ZHANG B, XU S, LIU M, et al. The nucleoprotein of influenza A virus inhibits the innate immune response by inducing mitophagy[J]. Autophagy, 2023, 19(7): 1916－1933.
[7] DANIELLE IULIANO A, ROGUSKI K M, CHANG H H, et al. Estimates of global seasonal influenza－associated respiratory mortality: a modelling study[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1285－1300.
[8] LAURE M, HAMZA H, KOCH－HEIER J, et al. Antiviral efficacy against influenza virus and pharmacokinetic analysis of a novel MEK－inhibitor, ATR－002, in cell culture and in the mouse model [J]. Antiviral Res, 2020, 178: 104806.
[9] LEDDEROSE C, VALSAMI E A, ELEVADO M, et al. ATP release from influenza－infected lungs enhances neutrophil activation and promotes disease progression[J]. J Infect Dis, 2023, 64: 815－827.
[10] 吴贞琳, 吴煜佳, 张悦瑶, 等. 流感病毒性肺炎线粒体相关生物标志物识别及银翘败毒散潜在作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(3): 882－894.
[11] HE Q Q, HUANG Y, NIE L, et al. MAVS integrates glucose metabolism and RIG－I－like receptor signaling[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 534.
[12] LIU H, YOU L M, WU J, et al. Berberine suppresses influenza virus－triggered NLRP3 inflammasome activation in macrophages by inducing mitophagy and decreasing mitochondrial ROS[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(1): 253－266.
[13] MARTÍNEZ－SOBRIDO L, ZÚÑIGA E I, ROSARIO D, et al. Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus[J]. J Virol, 2006, 80(18): 9192－9199.
[14] RASHID F, XIE Z, LI M, et al. Roles and functions of IAV proteins in host immune evasion[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1323560.
[15] KUMAR H, KAWAI T, KATO H, et al. Essential role of IPS－1 in innate immune responses against RNA viruses[J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1795－1803.
[16] ZHANG J Z, LIU Z, LIU J, et al. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF－kappaB expression in lung tissue[J]. Int J Mol Med, 2023, 51(3): 19－25.
[17] 陈威巍, 谢杨新, 张云辉, 等. 甲型 H1N1 流感患者外周血白细胞和淋巴细胞亚群变化分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(5): 331－333.
[18] 杨英, 龙琼, 杨颖, 等. 精氨酸－甘氨酸－天冬氨酸序列修饰对流感病毒溶瘤能力的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 35(5): 551－556.
[19] LEMCKE R, EGEBJERG C, BERENDTSEN N T, et al. Molecular consequences of peripheral Influenza A infection on cell populations in the murine hypothalamus[J]. Elife, 2023, 165: 1750－1759.
[20] SIEGERS J Y, VAN DE BILDT MWG, LIN Z M, et al. Viral factors important for efficient replication of influenza A viruses in cells of the central nervous system[J]. J Virol, 2019, 93(11): 2273－2318.
[21] 周艳琳, 谷李铭, 李康生, 等. 滴鼻感染甲型流感病毒对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠自发行为学的比较研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(16): 1931－1934, 1940.
[22] NOURI H R, SCHAUNAMAN N, KRAFT M, et al. Tollip deficiency exaggerates airway type 2 inflammation in mice exposed to allergen and influenza A virus: role of the ATP/IL－33 signaling axis [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1304758.
[23] 魏述程, 岳冬辉, 于连贺, 等. 甘露消毒丹治疗湿热类疾病临床研究概述[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(5): 735－738.
[24] 李晓菲. 甘露消毒丹挥发油干预雾霾条件下 IV 感染小鼠黏膜免疫研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
[25] 侯宏彬. 甘露消毒丹精简方调控雾霾环境下 IV 感染小鼠 NLRP3 炎性小体的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.

甘露消毒丹对流感病毒感染“升清降浊”的机制研究

（正文见 21－25 页）

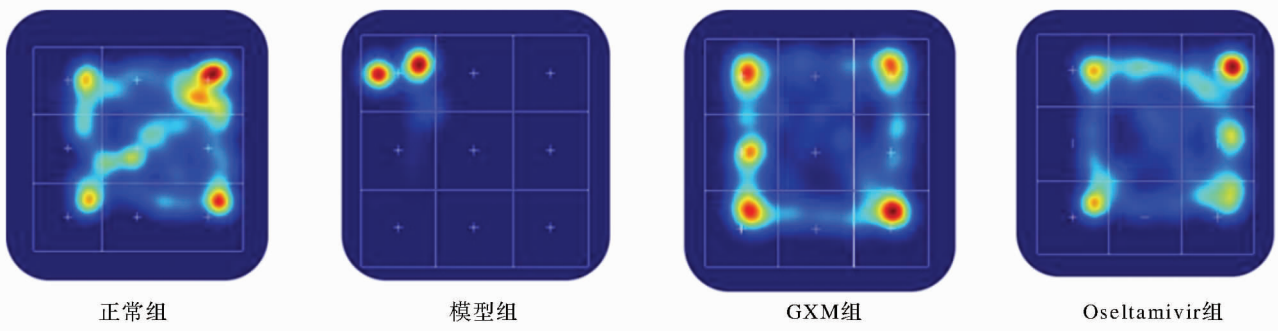


图 1　各组小鼠旷场实验中总轨迹变化

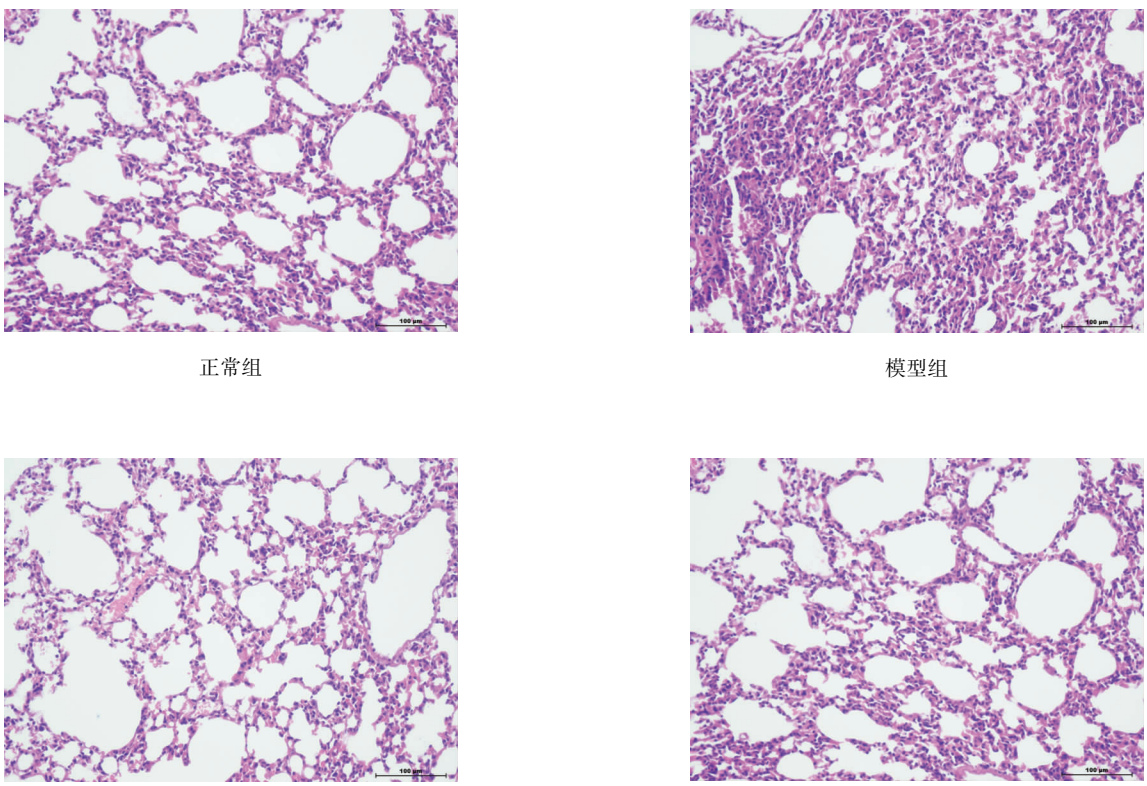
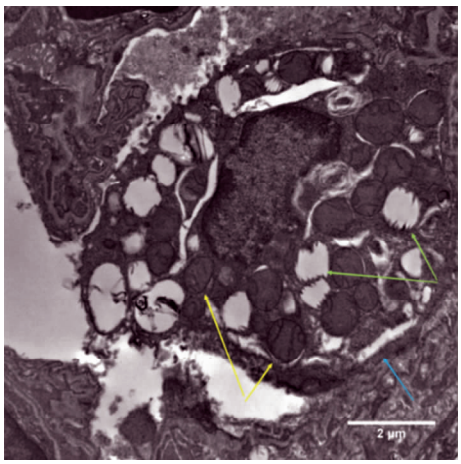
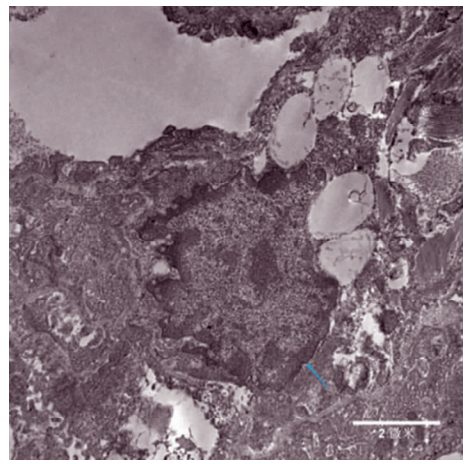


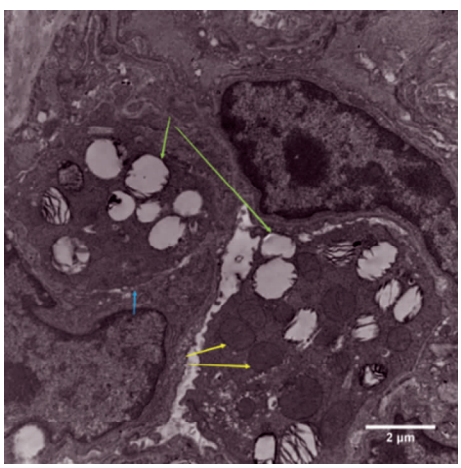
图 2　各组小鼠肺组织病理结构（HE，200 ×）



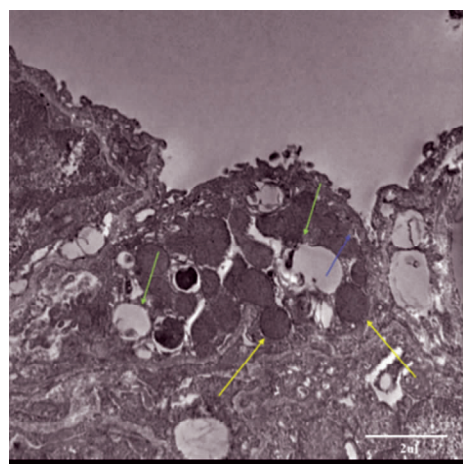
正常组



模型组



GXM 组



Oseltamivir 组

注:黄色为线粒体,绿色为板层小体,蓝色为细胞膜。
图 3 各组小鼠肺组织超微结构改变(电镜:10 000 ×)