

呼吸系统疾病实验室研究专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.09.001

## 基于 JAK/STAT 信号通路探讨连花清瘟颗粒对甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织的保护作用及机制<sup>\*</sup>

樊高薇,薛敬东,李警卓<sup>△</sup>

陕西省中医医院急诊科,陕西西安 710003

**摘要:**目的 基于 Janus 激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路,探讨连花清瘟颗粒对甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织的保护效果及机制。方法 使用不同稀释倍数的甲型 H1N1 流感病毒液感染 BALB/c 小鼠,观察小鼠存活率及肺水肿严重程度,从而确定造模病毒稀释倍数。设置模型组(H1N1 组)、连花清瘟颗粒组(LC 组)及对照组,各 10 只。LC 组予连花清瘟颗粒(5 g/kg)溶液灌胃 5 d 后,滴鼻感染甲型 H1N1 流感病毒,然后持续给药干预 5 d;H1N1 组滴鼻感染甲型 H1N1 流感病毒,对照组用与造模病毒液同体积的生理盐水滴鼻;在 LC 组给药的同时,H1N1 组与对照组均用同体积生理盐水灌胃。观察各组小鼠健康状况,采用实时荧光定量 PCR 检测小鼠肺组织 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平,观察肺组织病理学变化,采用 Western blot 检测小鼠肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平,采用 ELISA 检测小鼠血清 IgG 水平。结果 确定使用稀释倍数为 100 的病毒液进行造模。与对照组比较,H1N1 组、LC 组 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平明显升高,而相较于 H1N1 组,LC 组 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。对照组小鼠肺组织正常;H1N1 组小鼠肺组织出现充血、水肿现象,同时发生弥漫性炎症细胞浸润,伴有上皮细胞脱落、坏死,发现支气管上皮细胞变形;LC 组小鼠相较 H1N1 组小鼠肺组织水肿、充血现象减轻,炎症细胞浸润明显减少,肺部病变得以缓解。与对照组比较,H1N1 组小鼠肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。H1N1 组小鼠血清 IgG 水平明显高于对照组,LC 组小鼠血清 IgG 水平明显高于对照组、H1N1 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 连花清瘟颗粒可以抑制甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠体内 JAK/STAT 信号通路,增强小鼠免疫力,减少小鼠肺组织损伤。

**关键词:**Janus 激酶/信号转导及转录激活因子信号通路; 连花清瘟颗粒; 甲型 H1N1 流感病毒; 动物实验

中图法分类号:R511.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)09-1153-06

### Protective effect and mechanism of Lianhua Qingwen granules on the lung tissue of mice with influenza A H1N1 virus pneumonia based on JAK/STAT signaling pathway<sup>\*</sup>

FAN Gaowei, XUE Jingdong, LI Jingzhuo<sup>△</sup>

Department of Emergency, Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710003, China

**Abstract: Objective** Base on the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway, the protective effect and mechanism of Lianhua Qingwen granules on the lung tissue of mice with influenza A H1N1 virus pneumonia are investigated. **Methods** BALB/c mice were infected with influenza A H1N1 virus solution of different dilution ratios, and the survival rate of mice and the severity of pulmonary edema were observed to determine the dilution ratio of modeling virus. The model group (H1N1 group), Lianhua Qingwen granules group (LC group) and control group were set up, with 10 mice in each group. In the LC group, Lianhua Qingwen granules (5 g/kg) solution were given intragastrically for 5 days and then infected with influenza A H1N1 virus by intranasal drip, and then continued to intervene with drug for 5 days. The H1N1 group was infected with influenza A H1N1 virus by intranasal instillation. The control group was intranasally instilled with the same volume of normal saline as the model virus solution. As the same time as the LC group was administered, the H1N1 group and control group were given the same volume

<sup>\*</sup> 基金项目:陕西省科技计划项目(2020LCZX-02)。

作者简介:樊高薇,女,主治医师,主要从事中医内科相关疾病研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 853857989@qq.com。

本文引用格式:樊高薇,薛敬东,李警卓. 基于 JAK/STAT 信号通路探讨连花清瘟颗粒对甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织的保护作用及机制[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(9): 1153-1157.

of normal saline by gavage. The health status of the mice in each group was observed, and the expression levels of JAK1 and STAT3 mRNA in the lung tissue of the mice were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The histopathological changes of the lung were observed. Western blot was used to detect the expression levels of JAK1 and STAT3 protein in the lung tissue of the mice, and ELISA was used to detect the serum IgG level of the mice. **Results** The virus solution with dilution ratio of 100 was used for modeling. Compared with the control group, the expression levels of JAK1 and STAT3 mRNA in the H1N1 group and the LC group were significantly increased, compared with the H1N1 group, the expression levels of JAK1 and STAT3 mRNA in the LC group were significantly decreased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The lung tissue of the mice in the control group was normal. The lung tissue of the mice in the H1N1 group showed congestion and edema, and at the same time diffuse inflammatory cell infiltration occurred, accompanied by epithelial cell shedding and necrosis, and the bronchial epithelial cells were found to be deformed. Compared with the mice in the H1N1 group, the lung tissue edema and congestion of the mice in the LC group were reduced, the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced, and the lung lesions were relieved. Compared with the control group, the expression levels of JAK1 and STAT3 proteins in the lung tissue of the mice in the H1N1 group were significantly increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The serum IgG level of the mice in the H1N1 group was significantly higher than that in the control group, and the serum IgG level of the mice in the LC group was significantly higher than that in the control group and the H1N1 group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Lianhua Qingwen granules could inhibit the JAK/STAT signaling pathway in mice with influenza A H1N1 virus pneumonia, enhance the immunity of mice, and reduce the damage of lung tissue in mice.

**Key words:** Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway; Lianhua Qingwen granules; influenza A H1N1 virus; animal experiment

作为威胁人类健康的传染性疾病之一,流行性感冒(简称流感)不仅发病率高,同时还有高传染率、高病死率的特点,尚不能得到有效控制。我国是流感高发国家之一,我国流感病死率较高,1997 年暴发的 H5N1 流感病死率高达 66%~80%<sup>[1]</sup>;2009 年新型甲型 H1N1 流感暴发,因其发病急,传播范围广,影响了全球 200 多个国家和地区;目前流感的治疗方式主要为抗病毒治疗,疫苗接种的保护率低,且成本较高<sup>[2-3]</sup>。甲型 H1N1 流感病毒已经成为引起重症肺炎的病原体之一,而且甲型 H1N1 流感病毒感染导致的重症肺炎往往容易进展为急性呼吸窘迫综合征<sup>[2-4]</sup>,因此,开展抗甲型 H1N1 流感病毒药物的研究仍具有重要意义。临床常将连花清瘟颗粒用于上呼吸道感染的治疗,在新型冠状病毒肺炎疫情发生后,连花清瘟颗粒也被用来预防及治疗新型冠状病毒肺炎,并且取得了较好的治疗效果,其可以广谱抗病毒,通过调节多种信号通路抑制病毒对细胞的侵袭。研究发现,在甲型 H1N1 流感病毒入侵机体的早期,机体会应激产生干扰素,干扰素可与细胞膜特异性受体(IFNAR)结合<sup>[5]</sup>,激活 Janus 激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路,使肺炎加重<sup>[6]</sup>,本研究旨在基于 JAK/STAT 信号通路,探究连花清瘟颗粒对甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织的保护效果及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源 SPF 级 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠

购自广东省医学实验动物中心,动物许可证号为 SCXK(粤)2019-0035,动物质量合格证号为 44007200052444。甲型流感病毒 A/FM/1/47(H1N1)购自中国药品生物制品检定所。

**1.2 仪器与试剂** 连花清瘟颗粒购自石家庄以岭药业股份有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录-PCR 试剂盒购自 Thermo Fisher 公司;实时荧光定量 PCR (qPCR)试剂盒购自 TaKaRa 公司;4%多聚甲醛购自 Sigma 公司;乙醚购自国药化学试剂有限公司;高效 RIPA 组织裂解液、蛋白酶抑制剂、BSA 封闭液、ECL 化学发光试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;小鼠 IgG 检测试剂盒(ELISA)购自南京建成生物工程研究所;蛋白检测试剂盒(BCA 法)购自北京索莱宝科技有限公司;JAK1、STAT3 酶标兔多克隆抗体购自 Sigma 公司。二级生物安全柜购自 Thermo Fisher 公司;BSA223S 电子天平购自 Sartorius 公司;ABI 7500 Real-Time PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;倒置显微镜购自 Leica 公司;垂直电泳仪、半干转印仪购自 Bio-Rad 公司;全自动数码凝胶/化学发光图像分析系统购自上海天能科技有限公司;超纯水仪购自 ELGA 公司;组织匀浆机购自天根生化科技(北京)有限公司;Tecan Infinite® 200 Pro 多功能酶标仪购自 Tecan 公司;CUT5062 型石蜡旋转式切片机购自 SLEE 公司;电热恒温鼓风干燥箱购自 Thermo Fisher 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠模型的建立** 将病毒原液稀释至 1、10、100、1 000、10 000 倍,每个稀释倍数对应 10 只小鼠,通过滴鼻感染小鼠,每只小鼠感染病毒量为 20  $\mu$ L,观察 10 d 后各组小鼠的存活情况。另取 25 只小鼠,每个稀释倍数对应 5 只,通过滴鼻感染小鼠,感染 5 d 后将小鼠用乙醚麻醉,然后摘下眼球,尽量流干血液,断颈处死,解剖后取出全肺,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后吸干表面水分,称取肺湿重,60  $^{\circ}$ C 烘箱内放置 24 h,称取肺干重,根据肺湿干重比评价小鼠肺水肿情况,肺湿干重比值越大,肺水肿越严重。同时,取 5 只小鼠纳入 NC 组,用同体积的生理盐水滴鼻,5 d 后称取肺干重、湿重,计算肺湿干重比。根据造模病毒稀释倍数选择原则,模型鼠应选择有较低存活率(低于 50%),同时肺湿干重比显著高于 NC 组的小鼠。

**1.3.2 分组及给药干预** 将 30 只小鼠随机分为模型组(H1N1 组)、连花清瘟颗粒组(LC 组)、对照组,每组 10 只。将 H1N1 组、LC 组小鼠用乙醚轻度麻醉后,用 1.3.1 确定稀释倍数的造模病毒液滴鼻感染小鼠,对照组用同体积的生理盐水滴鼻。根据连花清瘟颗粒的说明书,按 5 g/kg 的给药剂量,将连花清瘟颗粒溶解后对 LC 组小鼠进行灌胃给药 5 d,然后再进行 H1N1 流感病毒液滴鼻造模,感染 5 h 后继续给药 5 d;在 LC 组给药的同时,对照组、H1N1 组灌胃同体积生理盐水。

**1.3.3 小鼠健康状态观察** 自感染病毒后,观察 H1N1 组、LC 组、对照组小鼠健康状态,包括毛发是否顺滑,精神状态,是否有咳嗽、呼吸困难等。

**1.3.4 肺组织 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平检测** 感染病毒后 5 d,将 H1N1 组、LC 组、对照组小鼠用乙醚麻醉后进行解剖,取小鼠右肺组织约 3  $\text{cm}^3$ ,迅速放入无菌 EP 管中,液氮处理 15 min,转移至 -80  $^{\circ}$ C 保存备用。根据 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,根据反转录-PCR 试剂盒说明书进行反转录,得到 cDNA,用 qPCR 检测 JAK1、STAT3 mRNA 的表达水平,内参基因为  $\beta$ -actin。JAK1 正向引物 5'-GCCAGTGCCCTGAGTTACTT-3',反向引物 5'-GTCTGGATCTTGCCTGGTCA-3';STAT3 正向引物 5'-TGTGTGACACCATTTCATTGATGC-3',反向引物 5'-TGCCAGATTGCCCAAAGAT-3'。反应体系:qPCR SuperMix 10  $\mu$ L,正向引物、反向引物各 0.4  $\mu$ L,cDNA 模板 1  $\mu$ L,加纯水至反应体系总体积为 20  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算表达水平。

**1.3.5 肺病理组织观察** 取 LC 组、H1N1 组、对照组小鼠左肺组织约 3  $\text{cm}^3$ (避免镊子划伤组织),将组织固定于 4%多聚甲醛内,24 h 后更换多聚甲醛,按照

常规方法对组织进行石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色(HE 染色),显微镜下观察病理变化。

**1.3.6 肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平检测** 称取对照组、LC 组、H1N1 组小鼠肺组织各 50 mg,加入 300  $\mu$ L 提前配制的组织裂解液,匀浆机内充分搅匀,10 000 $\times$ g 离心 10 min,吸取上清液,采用 BCA 法检测蛋白,调节水平至 100 mg/mL,SDS-PAGE 电泳后进行转膜,BSA 封闭液封闭,孵育抗体,采用化学发光(ECL)试剂盒检测 JAK1、STAT3 蛋白表达水平。

**1.3.7 血清 IgG 水平检测** 将对照组、LC 组、H1N1 组小鼠摘取眼球后取血,4  $^{\circ}$ C 冰箱内静置过夜,11 800 $\times$ g 离心 10 min,吸取上清液,按照小鼠 IgG 检测试剂盒(ELISA)说明书检测血清 IgG 水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism6.0 软件作图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同稀释倍数病毒液感染后小鼠存活率变化** 感染 10 d 后,NC 组无死亡,存活率为 100%;稀释倍数为 1 的病毒液感染的小鼠全部死亡,存活率为 0%;稀释倍数为 10、100 的病毒液感染的小鼠存活率均为 10%;稀释倍数为 1 000 的病毒液感染的小鼠存活率为 20%;稀释倍数为 10 000 的病毒液感染的小鼠存活率为 70%,根据小鼠存活率,可将 10、100、1 000 作为造模备选稀释倍数。

每天统计不同稀释倍数病毒液感染小鼠和 NC 组小鼠的死亡数,稀释倍数为 1 的病毒液感染的小鼠第 5 天开始出现死亡,存活率持续下降,第 9 天存活率为 0%;稀释倍数为 10、100、1 000 的病毒液感染的小鼠第 6 天开始出现死亡,存活率持续下降;稀释倍数为 10 000 的病毒液感染的小鼠第 7 天开始出现死亡,存活率一直保持较高水平,见图 1;因此,可在病毒感染第 5 天,保证小鼠未死亡的前提下观察各项指标。

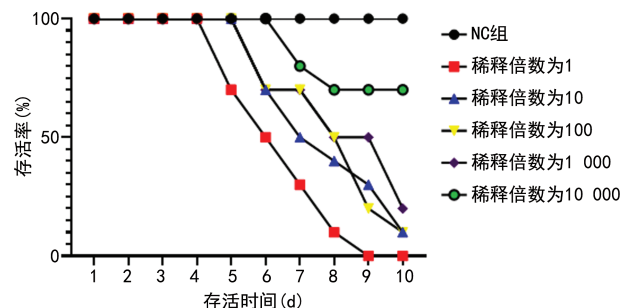


图 1 不同稀释倍数病毒液感染的小鼠及 NC 组小鼠存活率变化情况

**2.2 不同稀释倍数病毒液感染 5 d 后小鼠肺湿干重比** 感染 5 d 后,与 NC 组比较,稀释倍数为 1、10、100

的病毒液感染的小鼠肺湿干重比明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。根据造模病毒稀释倍数选择原则,最终选用稀释倍数为 100 的病毒液进行造模,见表 1。

**2.3 小鼠健康状态观察** 对照组小鼠毛发顺滑、光亮,精神状态正常,无咳嗽、呼吸困难;H1N1 组小鼠毛发凌乱、暗淡,精神萎靡,伴有咳嗽、呼吸困难;LC 组小鼠毛发凌乱、暗淡,精神萎靡,但咳嗽症状相较于 H1N1 组有所改善。

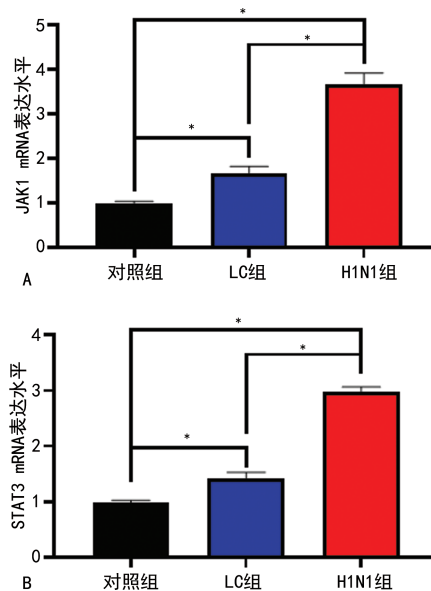
表 1 不同稀释倍数病毒液感染 5 d 后小鼠肺湿干重比与 NC 组比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | <i>n</i> | 湿重(g)       | 干重(g)       | 湿干重比        | <i>P</i> |
|--------|----------|-------------|-------------|-------------|----------|
| NC 组   | 5        | 0.117±0.010 | 0.029±0.009 | 4.374±1.465 | —        |
| 稀释倍数   |          |             |             |             |          |
| 1      | 5        | 0.176±0.018 | 0.031±0.005 | 5.652±0.607 | 0.03     |
| 10     | 5        | 0.179±0.007 | 0.032±0.005 | 5.721±0.735 | 0.04     |
| 100    | 5        | 0.170±0.011 | 0.027±0.006 | 6.232±0.541 | 0.03     |
| 1 000  | 5        | 0.125±0.011 | 0.025±0.007 | 5.389±1.997 | 0.23     |
| 10 000 | 5        | 0.128±0.008 | 0.026±0.003 | 4.893±0.614 | 0.34     |

注:*P* 为不同稀释倍数下小鼠肺湿干重比与 NC 组比较的 *P* 值;—表示无数据。

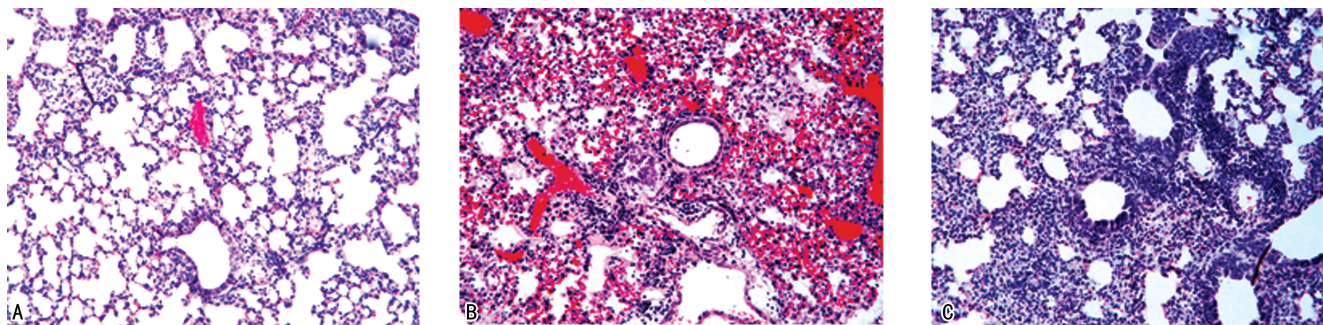
**2.4 3 组肺组织 JAK1、STAT3 mRNA 的表达水平比较** 与对照组比较,H1N1 组、LC 组 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平明显升高,而相较于 H1N1 组,LC 组 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

**2.5 肺组织病理学变化** 对照组小鼠肺组织正常,见图 3A;H1N1 组小鼠肺组织出现充血、水肿现象,同时发生弥漫性炎症细胞浸润,伴有上皮细胞脱落、坏死,发现支气管上皮细胞变形,见图 3B;LC 组小鼠相较于 H1N1 组小鼠肺组织水肿、充血现象减轻,炎症细胞浸润明显减少,肺部病变得缓解,但仍有局部肺泡间隔增厚,见图 3C。



注:A 为 3 组 JAK1 mRNA 表达水平比较;B 为 3 组 STAT3 mRNA 表达水平比较;\*  $P<0.05$ 。

图 2 3 组肺组织 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平比较

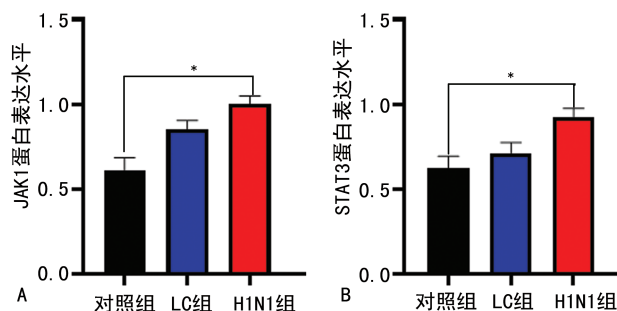


注:A 为对照组小鼠典型肺组织切片 HE 染色结果;B 为 H1N1 组小鼠典型肺组织切片 HE 染色结果;C 为 LC 组小鼠典型肺组织切片 HE 染色结果。

图 3 肺组织切片 HE 染色结果( $\times 100$ )

**2.6 3 组肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平比较** 与对照组比较,H1N1 组小鼠肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 LC 组小鼠肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平略高于对照组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 4、5。

**2.7 3 组血清 IgG 水平比较** H1N1 组小鼠血清 IgG 水平[(2.75±0.55)ng/mL]明显高于对照组[(1.15±0.23)ng/mL],LC 组小鼠血清 IgG 水平为(8.44±0.68)ng/mL,明显高于对照组、H1N1 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。



注:A 为 3 组肺组织 JAK1 蛋白表达水平比较;B 为 3 组肺组织 STAT3 蛋白表达水平比较;\*  $P<0.05$ 。

图 4 3 组肺组织 JAK1、STAT3 蛋白表达水平比较





图 5 3 组肺组织 JAK1、STAT3 蛋白 Western blot 图

### 3 讨 论

使用连花清瘟颗粒治疗流感具有一定效果。有研究发现,服用连花清瘟颗粒可有效抵抗甲型 H3N2 流感病毒感染,发挥预防作用<sup>[7]</sup>;还有研究以甲型 H1N1 流感病毒感染的 BALB/c 小鼠为研究对象,发现服用奥司他韦与连花清瘟颗粒均对感染小鼠的肺指数提升有明显的抑制作用<sup>[8]</sup>。通过查询 PubChem 数据库,发现连花清瘟颗粒在体内发挥作用时可涉及细胞对外部刺激反应的抑制、细胞凋亡、细胞信号传导等方面相关的 140 个靶蛋白,相关蛋白主要为蛋白激酶 B、胱天蛋白酶 3、丝裂原活化蛋白激酶 1、肿瘤因子 P53 等<sup>[9]</sup>。同时研究发现,连花清瘟颗粒可提高小鼠体内 CD4<sup>+</sup> 水平,可提高小鼠血清干扰素-γ 的表达,增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能,从而提高小鼠免疫功能<sup>[10]</sup>。临床研究发现,连花清瘟颗粒可缓解患者咳嗽、呼吸困难等临床症状,对流感的治疗效果好,尤其在发病早期可以明显减轻患者临床症状,且效果优于一般中成药;而在治疗甲型 H1N1 流感病毒感染方面,连花清瘟颗粒效果显著,不良反应少,安全性更高,同时还可作为预防用药<sup>[11-14]</sup>。本研究结果显示,使用连花清瘟颗粒干预后,甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠咳嗽、呼吸困难等临床症状得到改善,肺组织切片镜检显示炎症细胞浸润明显减少,水肿及充血现象得到缓解,说明连花清瘟颗粒可有效保护小鼠肺组织。同时,LC 组小鼠血清 IgG 水平为 (8.44±0.68) ng/mL,明显高于对照组、H1N1 组,提示使用连花清瘟颗粒治疗可以增强小鼠免疫功能。

探讨连花清瘟颗粒治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的相关机制具有重要意义。JAK/STAT 通路在甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的进展中起着重要作用<sup>[5-6]</sup>。JAK1、STAT3 蛋白是 JAK/STAT 信号通路的主要蛋白,研究发现,脾脏中具有丰富的 JAK1、STAT3 蛋白,一旦 JAK/STAT 信号通路被激活,可直接及间接促进肿瘤坏死因子-α 等炎症因子的产生,导致炎症发生<sup>[15-16]</sup>。此外,STAT3 的高表达直接参与了皮肤病的发生,如有研究发现,银屑病患者 STAT3 蛋白的表达显著上调<sup>[17]</sup>;荨麻疹患者 JAK/STAT 信号通路被激活,经过有效治疗后,STAT3 mRNA 表达水平显著下降,基因沉默 JAK/STAT 信号通路后,患者炎症症状减轻<sup>[15,18]</sup>。JAK1 是非受体

酪氨酸激酶;STAT3 是 STAT 家族一员,参与癌细胞的活化与增殖<sup>[19]</sup>。有研究指出,抑制 STAT3 的表达后,线粒体内氧化磷酸化活性被抑制,组胺分泌减少,因此,近年来 STAT3 常作为研究过敏性疾病治疗的新靶点<sup>[20]</sup>。本研究观察小鼠肺组织 JAK1、STAT3 的基因转录及表达水平发现,采用连花清瘟颗粒干预后甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织 JAK1、STAT3 mRNA 表达水平均明显降低,提示该药物可能通过抑制 JAK/STAT 信号通路发挥增强小鼠免疫力,降低炎症反应水平,保护小鼠肺组织的作用。连花清瘟颗粒在抗流感病毒感染方面有强大功效,在体外实验中还可抑制流感杆菌,而且由于作用靶点多,所以不易产生耐药性,其联合奥司他韦治疗对降低乙型流感病毒感染小鼠肺指数的作用优于奥司他韦单独治疗<sup>[21]</sup>。

综上所述,连花清瘟颗粒可以抑制甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠体内 JAK/STAT 信号通路,增强小鼠免疫力,减少小鼠肺组织损伤。

### 参考文献

- [1] YAN Y, ZOU Z, SUN Y, et al. Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model[J]. Cell Res, 2013, 23(2):300-302.
- [2] 汪文艳, 卢莉, 吕敏, 等. 中国首批次甲型 H1N1 流感疫苗上市后安全性与保护效果的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 30(5):481-484.
- [3] MEHRBOD P, ABDALLA M A, FOTOUHI F, et al. Immunomodulatory properties of quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside from rapanea melanophloeos against influenza A virus[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):184.
- [4] POULAKOU G, PÉREZ M, RELLO J. Severe acute respiratory infections in the postpandemic era of H1N1[J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18(5):441-450.
- [5] MAJOR J, CROTTA S, LLORIAN M, et al. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection[J]. Science, 2020, 369(6504):712-717.
- [6] KROETZ D N, ALLEN R M, SCHALLER M A, et al. Type I interferon induced epigenetic regulation of macrophages suppresses innate and adaptive immunity in acute respiratory viral infection [J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(12):e1005338.
- [7] DUAN Z P, JIA Z H, ZHANG J, et al. Natural herbal medicine Lianhuaqingwen capsule anti-influenza A (H1N1) trial: a randomized, double blind, positive controlled clinical trial[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(18):2925-2933.

(下转第 1162 页)

平出现不同的变化<sup>[15]</sup>。

深圳市罗湖区儿童呼吸道感染的高发年龄段是学龄前期,高发季节是秋季。呼吸道感染患儿(已明确病原学诊断)与健康儿童的淋巴细胞亚群水平存在明显差异,不同呼吸道感染疾病及不同病原体感染患儿的外周血淋巴细胞亚群水平也存在差异。

## 参考文献

- [1] MIFTODE E, VATA A, LECA D, et al. Community acquired acute bacterial meningitis: a 10 year review[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2009, 113(2): 402-409.
- [2] 徐香君. 呼吸道感染患者病原性细菌的临床检验分析[J]. 中国急救医学, 2016, 36(2): 122-123.
- [3] 杨晓红, 温柏平, 庄宇, 等. 呼吸道感染患儿的淋巴细胞亚群改变[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(11): 1327-1328.
- [4] 中国儿童免疫与健康联盟免疫评估工作组, 中国医师协会儿科医师分会风湿免疫专委会, 中国医师协会儿科医师分会儿童过敏专委会, 等. 流式细胞术分析外周血淋巴细胞亚群在儿科的临床应用专家共识(2019 版)[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(6): 424-428.
- [5] 曾纪扬, 陈美桂, 莫志宇. 超敏 C-反应蛋白、白细胞计数、红细胞沉降率、床旁降钙素原在小儿呼吸道感染中的联合检测价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(23): 3495-3498.
- [6] 梁导艳, 郭春艳, 封青, 等. 肺炎支原体感染患儿视黄醇结合蛋白和 T 细胞亚群的变化及意义[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12): 2053-2056.
- [7] 何健芳, 徐淑枫, 黄晶, 等. 血清 PCT 与 CRP 和血小板参数在支气管哮喘合并感染患儿中的应用价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(10): 1552-1554.
- [8] YAMAN A, ÇETINRER S, KIBAR F, et al. Reference ranges of lymphocyte subsets of healthy adults in Turkey [J]. Med Princ Pract, 2005, 14(3): 189-193.
- [9] AL-JABRI A A, AL-SHUKAILI A K, AL-RASHDI Z T, et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in healthy adult male Omanis [J]. Saudi Med J, 2008, 29(3): 409-412.
- [10] 邓素翰, 孙碧霞, 汪玲娟, 等. 儿童肺炎链球菌感染的临床特征及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(7): 1093-1096.
- [11] TOSATO F, BUCCIOL G, PANTANO G, et al. Lymphocytes subsets reference values in childhood [J]. Cytometry Part A, 2015, 87: 81-85.
- [12] 贾莉婷, 李静, 岳小欣, 等. 婴幼儿常见下呼吸道感染性疾病与淋巴细胞亚群变化关系的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 229-232.
- [13] 李素芳, 袁永红, 田军. 病毒性肺炎患儿的病原学及细胞免疫功能分析研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(6): 1278-1280.
- [14] LI H, CHEN K L, LIU M C, et al. The profile of peripheral blood lymphocyte subsets and serum cytokines in children with 2019 novel coronavirus pneumonia [J]. J Infect, 2020, 81(1): 115-120.
- [15] ADAMZIK M, BROLL J, STEINMANN J, et al. An increased alveolar CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cell ratio in acute respiratory distress syndrome is associated with increased 30-day mortality [J]. Intensive Care Med, 2013, 39(10): 1743-1751.
- [16] WANG X, HUANG X J, IHSAN A, et al. Metabolites and JAK/STAT pathway were involved in the liver and spleen damage in male wistar rats fed with mequindox [J]. Toxicology, 2011, 280(3): 126-134.
- [17] 张润田, 陈曦, 李玲玲, 等. 寻常型银屑病中医三证型形成与皮肤组织中 JAK1/STAT3 信号通路关系的研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(7): 1702-1705.
- [18] LIU X, YANG J, DENG W. The inflammatory cytokine IL-22 promotes murine gliomas via proliferation [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(3): 1087-1092.
- [19] 薛翔, 刘红梅, 邵旦兵, 等. JAK/STAT 信号通路调节机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(11): 2161-2165.
- [20] ERLICH T H, YAGIL Z, KAY G, et al. Mitochondrial STAT3 plays a major role in IgE-antigen-mediated mast cell exocytosis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134(2): 460-469.
- [21] 郝莉, 杨奎. 鱼腥草注射液抗甲型流感病毒实验研究[J]. 中国中医急症, 2007, 16(6): 713-714.

(收稿日期: 2021-09-22 修回日期: 2022-01-01)

(收稿日期: 2021-09-29 修回日期: 2021-12-30)

(上接第 1157 页)

- [8] 曾丽娟. 莲花清瘟胶囊拆方抗流感病毒药理机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [9] 王强, 刘亚欧, 李兴平. 银翘散对呼吸道黏膜 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中成药, 2013, 35(1): 165-167.
- [10] 李立, 赵静, 王雪飞, 等. 麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 346-350.
- [11] 卢宏达, 董克臣, 雷章, 等. 莲花清瘟对大鼠急性放射性肺损伤的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2014, 34(6): 419-422.
- [12] 夏敬文, 陈小东, 张静, 等. 莲花清瘟胶囊对慢性阻塞性肺病的治疗作用[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 35(3): 441-444.
- [13] 程霞. 莲花清瘟胶囊治疗急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(4): 39-40.
- [14] 崔洪波. 莲花清瘟胶囊治疗急性上呼吸道感染临床疗效观察[J]. 吉林医学, 2014, 35(19): 4296-4297.
- [15] 邹宇, 吕欣桐, 唐清体. 针灸联合自血疗法治疗慢性荨麻疹(血虚风燥型)效果及对 UAS 评分、外周血 T 淋巴细胞 STAT3 mRNA 表达水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1781-1784.