

· 论著 ·

[文章编号] 1007-0893(2023)22-0001-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.22.001

长生解毒汤抑制新型冠状病毒复制的体外实验研究

吴浩嘉¹ 麦智恒² 麦智谦² 刘文齐^{3,4} 张帆⁴ 李恒飞^{1,5,6,7*}

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 3. 国家感染性疾病临床医学研究中心, 广东 深圳 518112; 4. 深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518112; 5. 湖北省中医院肝病研究所 中医肝肾研究及应用湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430061; 6. 湖北中医药大学附属医院, 湖北 武汉 430061; 7. 湖北省中医药研究院, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 目的: 长生解毒汤是由天然本草及食物精华组成的具有扶正解毒功效的中医方剂, 但是否能抑制新型冠状病毒的复制并不清楚, 本研究旨在探讨长生解毒汤对于新型冠状病毒的抑制作用。方法: 建立非洲绿猴肾上皮 (Vero) 细胞细胞系, 使用不同稀释度的长生解毒汤进行细胞毒性试验以及实时荧光定量核酸扩增 (QPCR) 检测。结果: 长生解毒汤在稀释度高于 1:16 时, 对 Vero 细胞几乎没有毒性; 长生解毒汤在体外可以抑制严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 的增殖, 抑制 SARS-CoV-2 拷贝数 50 % 的长生解毒汤的稀释度为 1:45.024。当稀释度为 1:32 时, 长生解毒汤对于细胞毒性最低且对于 SARS-CoV-2 野生株的抑制程度较好。结论: 长生解毒汤对于新型冠状病毒具有一定的抑制作用, 且对 Vero 细胞毒性较低。

[关键词] 急性呼吸综合征冠状病毒 2; 长生解毒汤; 新型冠状病毒感染; 中药

[中图分类号] R 285 **[文献标识码]** A

In Vitro Experimental Study on the Inhibition of SARS-CoV-2 Replication by ChangShengJieDu Decoction

WU Haojia¹, MAI Zhiheng², MAI Zhiqian², LIU Wenqi^{3,4}, ZHANG Fan⁴, LI Hengfei^{1,5,6,7*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430065; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Guangzhou 510006; 3. National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Guangdong Shenzhen 518112; 4. The Third People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518112; 5. Institute of Liver Diseases, Hubei Key Laboratory of the theory and application research of liver and kidney in traditional Chinese medicine, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061; 6. Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061; 7. Hubei Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430074)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to look into the inhibitory effect of ChangShengJieDu decoction on SARS-CoV-2. ChangShengJieDu decoction is a traditional Chinese medicine formula made up of natural herbs and food extracts that have been shown to support justice and detoxification, but it is unclear whether it can inhibit the replication of SARS-CoV-2. **Methods** Vero cell line was established, and toxicity test and QPCR detection were performed with different dilutions of ChangShengJieDu decoction. **Results** ChangShengJieDu decoction had almost no toxicity to Vero cells at dilution higher than 1:16; ChangShengJieDu decoction could inhibit the proliferation of SARS-CoV-2 in vitro, and the dilution of ChangShengJieDu decoction that inhibited 50% of SARS-CoV-2 copies was 1:45.024. When the dilution was 1:32, ChangShengJieDu decoction had the lowest cytotoxicity and the best inhibition of wild SARS-CoV-2. **Conclusion** ChangShengJieDu decoction has certain inhibitory effect on SARS-CoV-2, and has low toxicity to Vero cells.

[Keywords] SARS-CoV-2; ChangShengJieDu decoction; COVID-19; Traditional Chinese Medicine

近年以来, 世界人民展开了对抗严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的拉锯战。由新型冠状病毒所造成的疫情已经持续了数年之久, 且在未来短期内仍然不会消散。新型冠状病毒属于 β 冠状病毒属, 是一种有包膜的正链单股核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 病毒^[1]。

[收稿日期] 2023 - 09 - 20

[基金项目] 湖北省自然科学基金联合基金项目 (2022CFD135)

[作者简介] 吴浩嘉, 男, 硕士研究生在读, 主要研究方向是中医药防治肝胆病及传染病的研究。

[※ 通信作者] 李恒飞 (E-mail: 26877767@qq.com)

冠状病毒 5' 端约 2/3 基因用于编码非结构性蛋白, 这些非结构蛋白形成多聚体, 行使复制酶和翻译功能; 剩余 1/3 基因编码 4 种冠状病毒结构蛋白, 包括 S 蛋白 (spike protein)、M 蛋白 (membrane protein)、E 蛋白 (envelope protein) 和 N 蛋白 (nucleocapsid protein) [2]。冠状病毒主要是通过其表面的 S 蛋白识别靶细胞上的相应受体进入细胞, 从而造成感染的发生 [3]。新型冠状病毒是引起新型冠状病毒感染的病原体, 感染患者多出现发热、咳嗽、肌痛、疲劳等症状, 病情严重可能会出现呼吸困难, 甚至进入重症监护室 (intensive care unit, ICU) 治疗 [4]。截至 2020 年 10 月 11 日, 已有超过 3700 万确诊新型冠状病毒肺炎和 100 万死亡病例 [5]。新型冠状病毒感染严重危害着人类的生命及身体健康, 给世界各国带来了重大的损失。现如今, 新冠状肺炎已更名为新型冠状病毒感染, 管控措施已降为乙类, 但新型冠状病毒仍在不断变异的过程中产生免疫逃逸和二次感染 [6]。对于新冠病毒的治疗仍处于重要地位。

3 年抗疫中, 中医药的作用功不可没。已有研究证明, 中医方剂拥有提高新型冠状病毒感染患者的阴性转化率 [7]、改善症状 [8] 等优势。吴鞠通言: “温疫者, 厉气流行, 多兼秽浊, 家家如是, 若役使然也。”新型冠状病毒感染兼具流行性、传染性, 属急性传染病, 亦属中医温疫的范畴 [9]。全小林院士认为, 本次疫情为寒湿裹挟戾气侵袭人体之“寒湿疫”, 以寒湿伤阳为主, 兼有化热、变燥、伤阴、致瘀、闭脱等变证 [10]。也有学者认为是本次疫情中的湿内外合邪而致湿毒, 随患者体质而有湿热、寒湿等不同表现 [11]。全国各地新型冠状病毒感染证候虽有差异, 但治则总体上不离分消走泄、清热化湿、解毒凉血、救逆固脱 [12]。同得心长生解毒汤是由香港同得心生物科技有限公司研发, 采用药食同源的天然本草及食物精华组成。配方中主要由桑葚、蒲公英、五味子、姜、蜂蜜、苦瓜、玉米须、金银花、鲜白茅根、红甜椒、番茄、苹果、山药、橘皮、罗汉果、龙眼肉、山楂、葛根、大枣、赤小豆、薄荷、贝母、莲子、玉竹、桑叶、五指毛桃、鱼腥草、火龙果、芡实、黄精、桔梗、百合、菊花、甘草构成, 具有扶正解毒的功效。长生解毒汤对于新型冠状病毒感染的疗效尚不确切, 本研究旨在探究长生解毒汤对于新型冠状病毒的抑制效果。

1 实验方法

1.1 实验材料及仪器

非洲绿猴肾上皮 (Vero) 细胞由深圳市第三人民医院肝病研究所提供; “长生解毒汤”由同得心香港生物科技有限公司提供; DMEM 培养基购于 Gibco; 恒温箱于 Thermo 公司采购; 多功能酶标仪于 Thermo 公司

采购; SARS-CoV-2 野生株由第三人民医院肝病研究所提供; 实时荧光定量核酸扩增 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, QPCR) 仪购于 Thermo 公司; 低速离心机购于 Thermo 公司; 生物安全柜购于 Thermo 公司。

1.2 细胞系建立

将 Vero 细胞从液氮中取出, 迅速将其放入 37 °C 的水浴中, 并轻轻摇动冷冻保存管以溶解冷冻保存液。冷冻保存液溶解后, 将 Vero 细胞转移至装有 15 mL 培养基的离心管中, 置于离心机中, 并通过离心 (室温下 1000 r · min⁻¹, 5 min, 离心半径 195 mm) 收集细胞。离心后丢弃上清液, 并将细胞悬浮在含有 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基中。将细胞接种在培养皿中, 轻轻吸移并混合, 并在 37 °C、5 % CO₂ 饱和湿度条件下培养。根据细胞生长状态适时更换培养基。当细胞达到一定密度时, 使用胰酶消化后收集离心, 加入适量培养基重悬后移入新的培养皿中培养, 并根据细胞生长状态适时更换培养基。每当达到一定密度时进行细胞传代, 形成稳定细胞系以供后续实验使用。

1.3 细胞毒性检测

取生长状态良好的 Vero 细胞, 用培养基调节细胞密度, 将细胞密度调节至 $8 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后将其置入 96 孔板中。将 100 μL 细胞悬液置于孔板的每个孔中。将其混匀, 37 °C 培养细胞 [在细胞孔周围孔内加入 100 μL 无菌磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS)] ; 使用培养基将长生解毒汤分别按照 1:2048、1:1024、1:512、1:256、1:128、1:64、1:32、1:16、1:8、1:4 比例稀释, 每组设置 3 个复孔, 同时使用去离子水作为阴性对照, 培养 4 h 后进行细胞计数试剂盒检测 (cell counting kit-8, CCK-8)。每孔加入 20 μL CCK-8, 37 °C 培养 4 h; 用酶标仪对孔板各孔在 450 nm 波长下进行吸光值 A (optical density, OD) 的检测。

1.4 长生解毒汤抑制试验

取生长状态良好的 Vero 细胞, 用培养基调节细胞密度, 将细胞密度调节至 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后将其置入 6 孔板中。加入不同稀释度的长生解毒汤预处理 1 h。使用 SARS-CoV-2 野生株感染 2 h (感染性实验均在 P3 实验室中进行)。去除上清后加入不同稀释度的长生解毒汤培养 48 h。取 100 μL 细胞培养上清利用核酸自动提取试剂盒进行 RNA 提取, 利用 QPCR 检测 SARS-CoV-2 的拷贝数。

2 结果

2.1 长生解毒汤对 Vero 细胞的细胞毒性

当稀释度高于 1:512 时, 长生解毒汤 (csjdt) 随着稀释

度的降低, $A(OD)$ 值略有降低。当稀释度低于 1:512 时, 随着稀释度的降低, $A(OD)$ 值逐渐升高, 并于 1:32 达到最高峰, 即此稀释度下长生解毒汤对 Vero 细胞的细胞毒性最低。当稀释度小于 1:32 时, 随着稀释度降低 $A(OD)$ 值大幅降低, 见图 1。值得注意的是, 当稀释度处于 1:16 ~ 1:256 时, 细胞毒性低于无菌水 (control) 阴性对照。

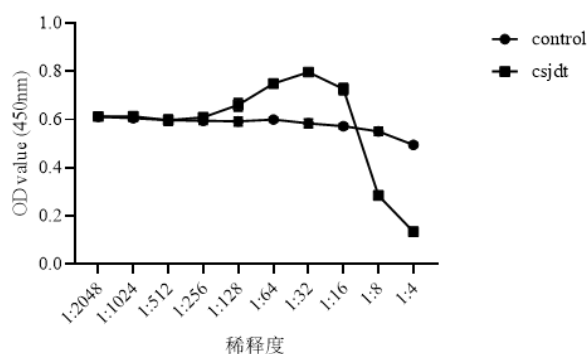


图 1 长生解毒汤对 Vero 细胞的细胞毒性测试

2.2 长生解毒汤对于 SARS-CoV-2 的抑制作用

一定稀释度的“长生解毒汤 (csjdt)”可以抑制 SARS-CoV-2 的增殖, 抑制 SARS-CoV-2 拷贝数 50 % 的长生解毒汤的稀释度为 1:45.024, 见图 2。

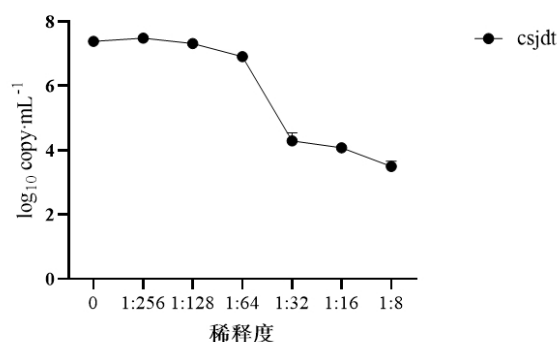


图 2 长生解毒汤对 SARS-CoV-2 抑制作用

3 讨论

长生解毒汤, 又名桑葚蒲公英汤, 是一款药食同源的方剂, 有一定的治疗作用, 且无明显的副作用。本实验中, 使用培养基将长生解毒汤以不同比例稀释, 经过 CCK-8 细胞毒性检测试验, 笔者发现当稀释度高于 1:16 时, 长生解毒汤对 Vero 细胞毒性较低。当其稀释度位于 1:256 ~ 1:16 时, 其细胞毒性低于阴性对照, 这可能与长生解毒汤具有的扶正功效有关。方中桑葚滋阴养血、生津润燥, 能够提升人体淋巴细胞的增殖力, 进而增强人体免疫力^[13]。野山灵芝能够补气安神, 其提取物灵芝多糖能够增强体液免疫和细胞免疫反应^[14]。山药具有补气

养阴、补脾益肾之功效, 已有动物实验表明, 山药能够增强免疫及调节胃肠功能^[15]。龙眼肉补益心脾, 其成分龙眼肉多糖 LPII 可显著增强 B 淋巴细胞和巨噬细胞的免疫功能^[16]。玉竹润燥养阴, 通过小鼠实验发现其同样具有增强免疫的作用^[17]。桑葚、野山灵芝、山药、龙眼肉、玉竹共补气阴脾肾, 使解毒的同时不伤正气, 且注重脾胃的顾护。山楂行气降脂健胃, 使补而不滞。葛根生津止渴, 养护阴液。

长生解毒汤能达到扶正解毒的目的, 可能与其有效地运用消、补之法有关。在抗炎和抑制病毒之余兼具辅助正气的草本和食物配合。例如方中的五指毛桃、甘草等。五指毛桃性温, 味甘, 能健脾利湿、行气化痰、舒筋活络。甘草味甘, 性温, 气平, 其具有补中益气、化痰止咳、缓急解毒之功。两者皆入脾经, 能健运脾胃以行气化湿, 补益上、中焦之气, 中焦脾土健运, 能助肺行其水道, 湿邪自化, 痰无以生, 寓培土生金之意。现代研究表明, 五指毛桃中富含补骨脂素, 其对机体免疫调节有明显作用^[18]。甘草中提取的甘草多糖, 其对感染引发的炎症等疾病表现出治疗活性, 也具有多种不同的功效, 如抗炎症、抗病毒、抗氧化等。甘草多糖可作为免疫增强剂来增强机体固有免疫力, 激活淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞, 促进细胞因子的生成, 改善机体的免疫功能, 促进体液免疫和细胞免疫应答, 在多层面对免疫系统发挥调节作用^[19]。

在使用不同稀释度的长生解毒汤稀释液预处理, SARS-CoV-2 野生株感染后进行 QPCR 检测发现, 当长生解毒汤稀释度在 1:45.024 时, 该比例稀释度可抑制 50 % 的新冠病毒生长。另外, 此稀释度对于 Vero 细胞的毒性较低。方中蒲公英、金银花、鱼腥草等皆具有清热解毒之功效。其中蒲公英具有抑菌、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、抗炎、利尿、调节免疫等多种功效, 其对多种病毒、真菌、革兰阴性菌及阳性菌等都能起到不同程度的抑制效果^[20], 蒲公英能阻断 SARS-CoV-2 棘突与人类血管收缩素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 受体蛋白质-蛋白质相互作用^[21]; 金银花提取物对新冠病毒棘突蛋白 /ACE2 的结合具有中断作用^[22]。鱼腥草作用广泛, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节等作用, 其黄酮类、挥发油类、多糖类成分具有良好的抗病毒作用^[23]。鱼腥草能够调节免疫细胞、免疫因子以及补体系统, 例如调节巨噬细胞和 T 细胞的数量, 调节细胞因子如调节促炎因子、多种白细胞介素, 诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达和环氧化酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达等, 进而达到提高免疫的作用^[24]。中医认为, 本次疫情以“湿”为主^[25]。方中白茅根、赤小豆有利尿之功效, 使“湿”从小便而出。陈皮燥湿健脾兼顾理气, 在祛除湿邪的同时顾护胃气。湿邪易酿生水湿, 在热邪相助下更易炼液

成痰，方中贝母清热化痰，防止痰湿阻遏气机。肝主疏泄，调节全身气机，气可推动全身水液的运行，加入薄荷，能够调节气机以行水，本方中加入薄荷，意在调节气机以行三焦之水。当稀释度处于 1:32 时，可认为是最佳稀释度，该稀释度下的长生解毒汤既可增强细胞活性，且对于 SARS-CoV-2 野生株感染具有较强的抑制作用，这可能是本方发挥扶正解毒作用的最佳浓度。

4 总 结

长生解毒汤是可治疗新型冠状病毒感染的方剂，当长生解毒汤稀释度处于 1:32 时，可在增强细胞活性的同时抑制新型冠状病毒的复制。另外该方的多数药物也在日常食物中扮演着重要的角色，在尽可能少的副作用下发挥了更大的作用。但该方剂的分子方面的作用机制仍不清楚，且需要更多的体内实验及临床试验以明确疗效。

【参考文献】

- [1] JACKSON C B, FARZAN M, CHEN B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23 (1): 3-20.
- [2] 周娟, 李丹, 龙云铸. 新型冠状病毒(2019-nCoV)相关研究进展 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19 (3): 288-292.
- [3] 苏石, 李小承, 蒿花, 等. 新型冠状病毒的研究进展 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2020, 41 (4): 479-482, 496.
- [4] 刘映霞, 杨扬, 张聪, 等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染患者肺损伤相关的临床及生化指标研究 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2020, 50 (3): 258-269.
- [5] WANG M Y, ZHAO R, GAO L J, et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 587269.
- [6] 王彩乔, 余鹏博. 新型冠状病毒关切变异株的研究进展 [J]. *传染病信息*, 2022, 35 (6): 481-485, 501.
- [7] CHEN B, GENG P, SHEN J, et al. Traditional Chinese Medicine JingYinGuBiao Formula Therapy Improves the Negative Conversion Rate of SARS-CoV2 in Patients with Mild COVID-19 [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18 (15): 5641-5652.
- [8] LIU J, YANG W, LIU Y, et al. Combination of Hua Shi Bai Du granule (Q-14) and standard care in the treatment of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): A single-center, open-label, randomized controlled trial [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153671.
- [9] 王玉光, 齐文升, 马家驹, 等. 新型冠状病毒肺炎中医临床特征与辨证治疗初探 [J]. *中医杂志*, 2020, 61 (4): 281-285.
- [10] 仝小林, 李修洋, 赵林华, 等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略 [J]. *中医杂志*, 2020, 61 (6): 465-470, 553.
- [11] 杨道文, 李得民, 晁恩祥, 等. 关于新型冠状病毒肺炎中医病因病机的思考 [J]. *中医杂志*, 2020, 61 (7): 557-560.
- [12] 郑文科, 张俊华, 杨丰文, 等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎各地诊疗方案综合分析 [J]. *中医杂志*, 2020, 61 (4): 277-280.
- [13] 冯金梅. 桑葚的药理作用探析 [J]. *中国农业信息*, 2013, 154 (13): 239.
- [14] 林志彬. 灵芝抗肿瘤活性和免疫调节作用的研究进展 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 44 (5): 493-498.
- [15] 孙洋, 梅伦方. 山药药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9 (3): 50-51.
- [16] 易阳, 张名位. 龙眼肉多糖 LPII 的体外免疫调节活性评价 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30 (4): 63-67, 111.
- [17] 罗纯清, 王兴. 玉竹药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2018, 14 (7): 95-97.
- [18] 潘远安, 刘江红, 张志超, 等. 中药黄芪与五指毛桃的免疫调节机制及临床应用进展 [J]. *中医临床研究*, 2019, 11 (5): 141-143.
- [19] 柴美灵, 武晓英, 张晓红, 等. 甘草多糖的免疫调节和抗炎作用机制研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55 (5): 66-71.
- [20] 齐婧婧, 马铭一, 宋胜强. 蒲公英抗菌抗病毒作用及临床应用研究进展 [J]. *山东化工*, 2022, 51 (13): 76-79.
- [21] TRAN H T T, GIGL M, LE N P K, et al. In Vitro Effect of Taraxacum officinale Leaf Aqueous Extract on the Interaction between ACE2 Cell Surface Receptor and SARS-CoV-2 Spike Protein D614 and Four Mutants [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (10): 1055.
- [22] LAI K H, CHEN Y L, LIN M F, et al. Lonicerae Japonicae Flos Attenuates Neutrophilic Inflammation by Inhibiting Oxidative Stress [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11 (9): 1781.
- [23] 廖健婷, 郝晨静, 李博. 鱼腥草抗病毒作用研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37 (5): 224-228.
- [24] 郭洪麟, 徐涛, 张乔. 鱼腥草免疫作用及作用机制研究进展 [J]. *黑龙江医药*, 2022, 35 (1): 50-52.
- [25] 苗青, 丛晓东, 王冰, 等. 新型冠状病毒肺炎的中医认识与思考 [J]. *中医杂志*, 2020, 61 (4): 286-288.